

· 药物研究 ·

葛根素联合国产多孔钽对人成骨细胞 COL-I、OC、OPN 表达和细胞增殖的影响

刘永庆¹ 李琪佳² 甘洪全³ 王茜⁴ 张大鹏¹ 王志强^{3*}

1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000
2. 华北理工大学医学中心实验室, 河北 唐山 063000
3. 华北理工大学附属医院骨科, 河北 唐山 063000
4. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 63000

中图分类号: R684 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 02-0236-08

摘要: 目的 研究探索葛根素联合国产多孔钽支架材料对人成骨细胞 MG-63 COL-I、OC、OPN 表达和细胞增殖的影响。方法 实验分为:葛根素组;不同浓度的葛根素与成骨细胞共培养(CCK-8 法筛选出葛根素作用最佳剂量浓度组);多孔钽组;国产多孔钽与成骨细胞共培养;葛根素多孔钽组;葛根素、国产多孔钽与成骨细胞共培养;空白组;成骨细胞培养。扫描电镜观察多孔钽及葛根素多孔钽-成骨细胞复合物表面形态;CCK-8 法检测成骨细胞的生长增殖状态;实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)和免疫细胞化学染色法检测成骨细胞 COL-I、OC、OPN mRNA 和蛋白的表达。结果 葛根素和多孔钽组较空白组均可促进成骨细胞的增殖($P < 0.05$);葛根素多孔钽组较其它各组细胞的增殖活性最显著($P < 0.05$)。RT-PCR 法和免疫细胞化学染色法结果显示,葛根素和国产多孔钽对成骨细胞 COL-I、OC mRNA 和蛋白表达均有影响($P < 0.05$),但对 OPN mRNA 和蛋白无显著影响($P > 0.05$)。结论 葛根素和国产多孔钽支架具有协同影响成骨细胞 COL-I、OC、OPN mRNA 和蛋白的表达,以及促进成骨细胞的增殖。

关键词: 中医中药;葛根素;多孔钽;I 型胶原;骨钙素;骨桥蛋白

The influence of puerarin combined with domestic porous tantalum on the expression of COL-I, OC, OPN and cell proliferation of osteoblasts

LIU Yongqing¹, LI Qijia², GAN Hongquan³, WANG Qian⁴, ZHANG Dapeng¹, WANG Zhiqiang^{3*}

1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China
 2. Experimental Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China
 3. Department of Anatomy, Basic Medicine College of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China
 4. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China
- Corresponding author: WANG Zhiqiang, Email: wzhqde@163.com

Abstract: **Objective** To explore the influence of Puerarin combined with domestic porous tantalum on the expression of COL-I, OC and OPN and cell proliferation of osteoblasts. **Methods** There were four experimental groups including Puerarin group; different concentrations Puerarin co-cultured with osteoblasts (CCK-8 method was used to screen the optimal concentration dose group); Porous tantalum group; domestic porous tantalum co-cultured with osteoblasts; Puerarin porous tantalum group; Puerarin and domestic porous tantalum co-cultured with osteoblasts; Blank group; osteoblast culture. Scanning electron microscopy was used to observe the surface morphology of porous tantalum and puerarin porous tantalum osteoblasts. CCK-8 method was used to detect the growth and proliferation of osteoblasts. Real-time fluorescence quantitative PCR assay (RT-PCR) and immunocytochemistry staining were used to detect the expression of COL-I, OC, mRNA OPN and protein in osteoblasts. **Results** Compared with the

基金项目: 国家科技部科技支撑课题(2012BAE06B03);河北省科技支撑资助项目(16277776D);河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(20160225);河北省卫生计生委临床医学优秀人才研究项目(361036);华北理工大学博士科研启动基金资助项目

* 通讯作者: 王志强, Email: wzhqde@163.com

blank group, the proliferation of osteoblasts could be promoted by puerarin and porous tantalum ($P < 0.05$). Compared with other groups, the proliferation activity of the puerarin porous tantalum group was the most significant ($P < 0.05$). RT-PCR and immunocytochemistry staining showed that Puerarin and domestic porous tantalum have effect on the expression of COL-I, OC mRNA and protein in osteoblasts ($P < 0.05$), but there was no significant effect on OPN mRNA and protein ($P > 0.05$).

Conclusion Puerarin and domestic porous tantalum stent have synergistic effect the expression of COL-I, OC mRNA OPN and protein, as well as promoting the proliferation of osteoblasts.

Key words: Chinese medicine; Epuerarin; Porous tantalum; Type I collagen; Osteocalcin; Osteopontin

葛根素是从中药葛根中提取的主要药用成分,属于植物雌激素^[1]。近年研究发现,葛根素能剂量依赖性促进大鼠原代成骨细胞分化,对老年骨质疏松症和骨折愈合具有良好的治疗作用^[2]。葛根素可能通过雌激素受体介导促进成骨细胞增殖及骨形成作用,当葛根素在 1×10^{-10} mol/L 至 1×10^{-7} mol/L 浓度范围内时,其对成骨细胞促增殖作用最强^[3]。多孔钽材料呈三维连通多孔网状结构,表面均匀分布的蜂窝状孔隙,内部包含大量微孔结构,可增加细胞对纤维素的捕获能力并且能够促进成骨细胞黏附与聚集,加快骨整合及整合强度,促进骨长入,加快骨形成^[4]。本研究试图探讨植物类雌激素葛根素和国产多孔钽材料对成骨细胞增殖和分化的作用机制以及为临床应用植物雌激素和国产多孔钽支架材料治疗骨愈合和再生提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MG-63 人成骨细胞株购自北京协和医学院细胞库;国产多孔钽支架材料由重庆润泽医疗器械有限公司提供;葛根素购置陕西安康制药;JSM-6030LV 扫描电子显微镜购置日本电子株式会社;CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒购置北京天恩泽基因有限公司;RT-PCR 试剂盒购置美国 Invitrogen 公司;兔抗人 COL-I 抗体、兔抗人 OC 抗体、小鼠抗人 OPN 抗体和兔抗人 GAPDH 均购置于美国 ABGENT 公司。

1.2 方法

1.2.1 MG-63 人成骨细胞的培养:MG-63 人成骨细胞用含 10% FBS、1% NEAA、1% 双抗的 α -MEM 完全培养基培养,并置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中,约 2~3d 即可铺满瓶底,细胞生长汇合至 80% 时可进行传代。

1.2.2 扫描电镜观察:利用扫描电镜观察多孔钽支架材料表面结构、孔隙形态;观察培养第 5 天的多孔钽-成骨细胞和葛根素多孔钽-成骨细胞复合培养的多孔钽支架材料表面形态。

1.2.3 药物处理细胞:取对数生长期的 MG-63 细胞,培养 24 h 待细胞贴壁后,更换含有 1% FBS 的 α -MEM 培养基培养 24 h,使细胞同步化。然后加入不同终浓度的葛根素 (0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$),各浓度组设置 3 个复孔。

1.2.4 成骨细胞与葛根素和多孔钽支架材料共培养:国产多孔钽支架材料先用超声波清洗器清洗 15 min,高压蒸汽灭菌 30 min。放入无菌 6 孔板, α -MEM 培养液预湿,24 h 后弃去多余液体,备用。取 300 μL 密度为 2×10^4 个/mL 的不同终浓度的葛根素 (0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 药物处理细胞悬液,接种在多孔粗支架材料表面,置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱内培养 2 h,将多孔钽材料上下翻转,并按上述接种方法滴加材料另一面,并置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱内培养 2 h,各孔加入 2 mL 的 α -MEM 培养液,继续培养。

1.2.5 实验分组:葛根素组:不同终浓度葛根素 (0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$) 与 MG-63 人成骨细胞共培养。并筛选出葛根素作用最佳剂量浓度组,行进一步实验;多孔钽组:国产多孔钽支架与 MG-63 人成骨细胞共培养;葛根素多孔钽组:葛根素、国产多孔钽与 MG-63 人成骨细胞共培养;空白组:单纯 MG-63 人成骨细胞培养。

1.2.6 CCK-8 法检测各组对成骨细胞增殖的影响:取生长状态良好的 MG-63 细胞,制成单细胞悬液,6 组均以每孔 2×10^4 个/mL 的细胞密度接种于无菌 24 孔板中,将其置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,每隔 48h 更换 1 次培养基;连续培养至 7d,每隔 2 天每组各取 12 孔,每孔均更换 500 μL 新的培养基,并加入 50 μL CCK-8 溶液,将 24 孔板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养 2 h;在 24 孔板各孔中吸取 100 μL 上清并依次加至 96 孔板各孔中;在波长 490 nm 处用酶标仪检测 96 孔板各孔吸光度 (OD 值)。

1.2.7 RT-PCR 法检测各组细胞 COL-I、OC、OPN mRNA 的表达水平:按照 Trizol 一步法提取培养 5d 的各组成骨细胞总 RNA。并根据公式计算出总

RNA 浓度和纯度, RNA 浓度调整为 500 ng/ μ L, 利用 M-MuLV 逆转录酶合成 cDNA, 利用 Primer5.0 软件设计引物, 合成的各基因 PCR 引物序列 (如表 1)。利用 SYBR qPCR Mix 进行 PCR 扩增体系反应, 设定反 5 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 25 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 总共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。通过相对定量方法 Comparative Delta-delta Ct 分析 PCR 结果。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequences

基因	引物	引物序列 (5'-3')
GAPDH	Primer F	GGAAATGAATGGGAGCCGT
	Primer R	AGGAGAAATCGGGCCAGCTA
COL-1	Primer F	AGTGGTTTGGATGGTGCCAA
	Primer R	GCACCATCATTTCCACGAGC
OC	Primer F	CACCGAGACACCATGAGAGC
	Primer R	CGGATTGAGCTCACACACCT
OPN	Primer F	AAGCAGCTTTACAACAAATACCCAG
	Primer R	TTACTTGGAAGGCTCTGTGGG

1.2.8 免疫细胞化学染色法检测各组细胞 COL-1、OC、OPN 蛋白的表达情况: 将各组制成单细胞悬液, 以 1×10^6 个/mL 密度接种于预先置有无菌盖玻片的 6 孔板中。待细胞生长至半汇合后, 取出无菌盖玻片, PBS 洗盖玻片 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 弃去多聚甲醛溶液, PBS 洗 3 次; 滴加适量 0.5% Triton-100 至盖玻片上, 室温条件下裂解 20 min, PBS 洗 3 次, 2 min/次; 滴加适量 3% H_2O_2 至盖玻片

上, 室温孵育 15 min, 达到阻断内源性过氧化物酶的作用, PBS 洗 3 次; 滴加各适量一抗 (1:150); 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次, 2 min/次; 滴加适量二抗, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 进行 DAB 显色, 将盖玻片浸入梯度酒精内进行逐级脱水, 二甲苯透明, 中性树胶进行常规封片, 采用 Image Pro-Plus 图像分析软件半定量分析染色指数结果。

1.3 统计学分析

运用 SPSS17.0 统计软件对实验数据进行统计处理。统计分析采用单因素方差分析, 进行各组间两两比较时, 采用 *LSD-t* 检验方法, 进行两个实验因素的各水平组合的实验时, 采用两因素析因设计资料的方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜下观察多孔粗支架材料及复合物

国产多孔钽大体观察呈蜂窝状, 光洁, 质硬, 表面粗糙不平, 分布均匀的空隙, 针尖样大小 (图 1A)。扫描电镜观察, 国产多孔钽支架材料具有大量均匀分散的微孔结构, 直径约 400 ~ 600 μ m, 内部孔隙之间相互连通, 孔隙间小梁支柱呈微孔样结构 (图 1B)。扫描电镜下观察成骨细胞在多孔钽表面和微孔内成叠层黏附生长, 伸出细胞伪足, 细胞间相互连接并融合成片状, 分泌的基质覆盖于多孔钽支

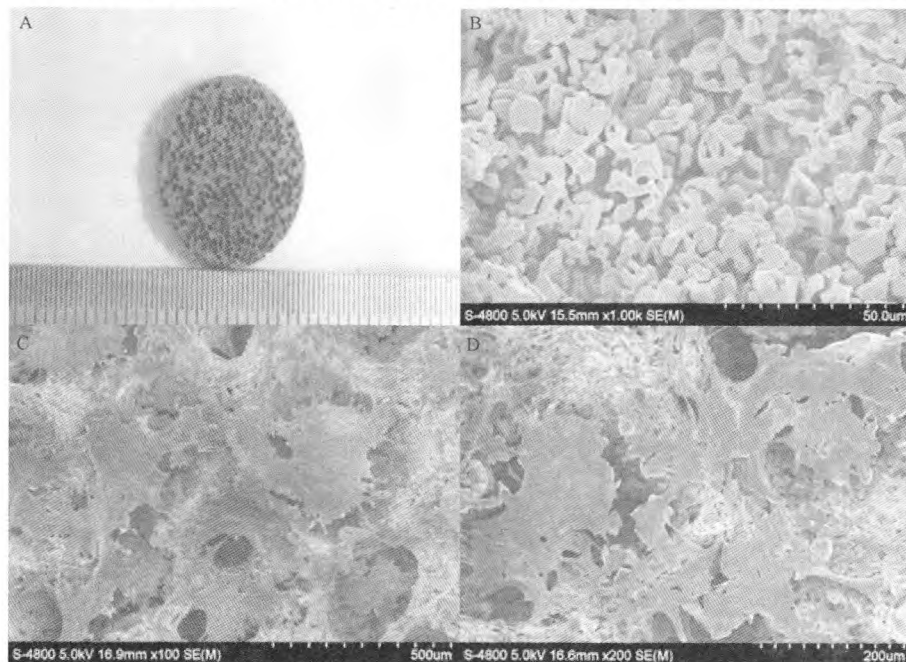


图 1 扫描电镜下观察多孔钽及成骨细胞复合物表面形态

注: A: 多孔钽大体形态; B: 多孔钽微孔结构; C: 葛根素多孔钽成骨细胞复合培养; D: 多孔钽成骨细胞复合培养

Fig. 1 The surface morphology of porous tantalum and osteoblast observed by scanning electron microscope

架表面及微孔内(图 1C、D)。表明人成骨细胞在国产多孔钽支架上伸展性良好,可连接成片状,细胞基质分泌正常,细胞及细胞基质可覆盖多孔钽表面。

2.2 各组成骨细胞增殖情况

通过酶标仪测得各组 OD 值(见表 2)。随着培养时间的延长,葛根素组细胞增殖活性显著高于空白组,但葛根素不同浓度组(0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1

$\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$),以葛根素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的生长最快,差异统计学意义($P < 0.05$);多孔钽组细胞增殖活性亦显著高于空白组($P < 0.05$);葛根素组和多孔钽组细胞增殖活性无统计学差异($P > 0.05$)。经析因方差分析得出,葛根素和多孔钽均可促进成骨细胞的增殖活性,两者之间具有协同促进细胞快速增殖的作用。

表 2 CCK-8 法检测各组细胞生长增殖情况(OD)

Table 2 CCK-8 to detect the osteoblasts proliferation in different groups of cells (OD)

组别	1d	3d	5d	7d
多孔钽组	0.178 $\pm$ 0.035 *	0.645 $\pm$ 0.105 *	1.158 $\pm$ 0.032 *	1.554 $\pm$ 0.052 *
葛根素组				
0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.172 $\pm$ 0.013	0.586 $\pm$ 0.025	1.132 $\pm$ 0.013	1.446 $\pm$ 0.026
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.181 $\pm$ 0.065	0.565 $\pm$ 0.025	1.130 $\pm$ 0.028	1.479 $\pm$ 0.046
1 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.185 $\pm$ 0.046 *	0.649 $\pm$ 0.046 *	1.145 $\pm$ 0.046 *	1.597 $\pm$ 0.046 *
葛根素多孔钽组	0.179 $\pm$ 0.013 Δ	0.748 $\pm$ 0.043 Δ	1.186 $\pm$ 0.037 Δ	1.765 $\pm$ 0.042 Δ
空白组	0.165 $\pm$ 0.035	0.423 $\pm$ 0.045	1.125 $\pm$ 0.042	1.348 $\pm$ 0.082

注: Δ : $P < 0.05$ VS 其它各组; *: $P < 0.05$ VS 空白组; *: $P < 0.05$ VS 空白组

2.3 各组成骨细胞 COL-I、OC 和 OPN mRNA 的表达水平

本实验通过比较 CT 法对数据进行分析处理,各组成骨细胞 COL-I、OC 和 OPN mRNA 的相对表达量结果(见表 3)。葛根素组和多孔钽组的 COL-I 与 OC mRNA 表达量均显著高于空白组($P < 0.05$),葛根素组和多孔钽组的 COL-I 与 OC mRNA 表达量无显著性差异($P > 0.05$),葛根素多孔钽组 COL-I 与 OC mRNA 表达量均显著高于其它各组,各组间 OPN mRNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),各组间经析因方差分析得出:葛根素和多孔钽均可促进成骨细胞 COL-I 与 OC mRNA 的表达,两者之间具有协同促进 COL-I 与 OC mRNA 的表达作用,但对 OPN mRNA 的表达无显著影响。

表 3 RT-PCR 法检测各组细胞 COL-I、OC 和 OPN mRNA 的表达($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The RT-PCR to assay COL-I, OC and OPN mRNA expression in different groups of cells($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	COL-I	OC	OPN
葛根素组	1.48 $\pm$ 0.58 *	1.50 $\pm$ 0.13 *	1.10 $\pm$ 0.12
多孔钽组	1.44 $\pm$ 0.61 *	1.52 $\pm$ 0.22 *	1.08 $\pm$ 0.28
葛根素多孔钽组	1.92 $\pm$ 0.25 Δ	1.87 $\pm$ 0.63 Δ	1.13 $\pm$ 0.56
空白组	1.00	1.00	1.00
F	23.607	20.463	2.401
P	0.003	0.001	0.125

注: Δ : $P < 0.05$ VS 其它各组; *: $P < 0.05$ VS 空白组; *: $P < 0.05$ VS 空白组

2.4 各组成骨细胞 COL-I、OC、OPN 蛋白的表达情况

采用 Image-Pro Plus 图像分析系统对各组进行半定量分析得出结果(见图 2、3、4 和表 4)。COL-I、OC 和 OPN 蛋白均表达于成骨细胞胞浆,阳性反应呈棕黄色颗粒,可见各组细胞均不同程度表达 COL-I、OC 与 OPN,细胞胞浆中可见大量棕黄色颗粒。葛根素组和多孔钽组的 COL-I 与 OC 表达量均显著高于空白组($P < 0.05$),葛根素多孔钽组 COL-I 与 OC 表达量均显著高于其它各组($P < 0.05$),葛根素组和多孔钽组的 COL-I 与 OC 表达量无显著性差异($P > 0.05$),但各组间 OPN 蛋白的表达量无统计学意义($P > 0.05$)。经析因方差分析得出:葛根素和多孔钽均可促进成骨细胞 COL-I 与 OC 蛋白的表达,两者之间具有协同促进 COL-I 与 OC 蛋白表达的作用,但对 OPN 蛋白的表达无显著影响。

表 4 免疫细胞化学染色法检测各组细胞 COL-I、OC、OPN 蛋白的表达($n = 9, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Immunocytochemical staining to detect COL-I, OC, OPN protein expression in different groups of cells($n = 9, \bar{x} \pm s$)

组别	COL-I	OC	OPN
葛根素组	16.690 $\pm$ 0.890 *	17.643 $\pm$ 1.328 *	16.243 $\pm$ 0.625
多孔钽组	16.943 $\pm$ 0.944 *	17.575 $\pm$ 1.043 *	16.345 $\pm$ 1.452
葛根素多孔钽组	18.170 $\pm$ 0.629 Δ	19.043 $\pm$ 1.328 Δ	16.382 $\pm$ 0.328
空白组	14.170 $\pm$ 0.538	16.243 $\pm$ 1.128	15.896 $\pm$ 0.628
F	17.682	18.258	2.674
P	0.000	0.000	0.064

注: Δ : $P < 0.05$ VS 其它各组; *: $P < 0.05$ VS 空白组; *: $P < 0.05$ VS 空白组

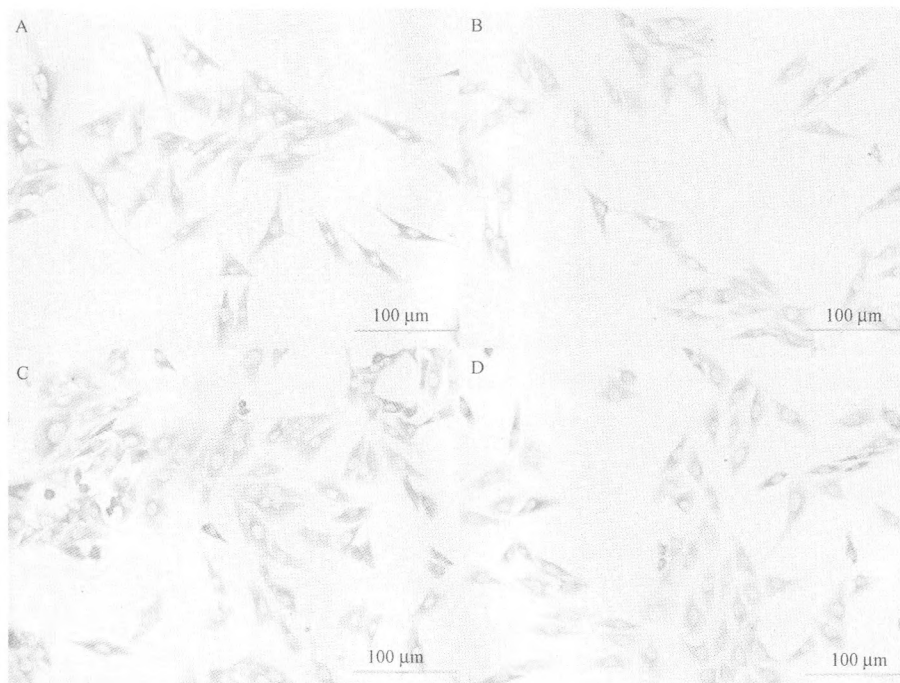


图 2 免疫细胞化学染色观察各组 COL-I 蛋白表达情况 (×200)

注:A:葛根素组;B:多孔钽组;C:葛根素多孔钽组;D:空白组

Fig. 2 The expression of COL-I protein of each group observed by immunocytochemical staining (×200)

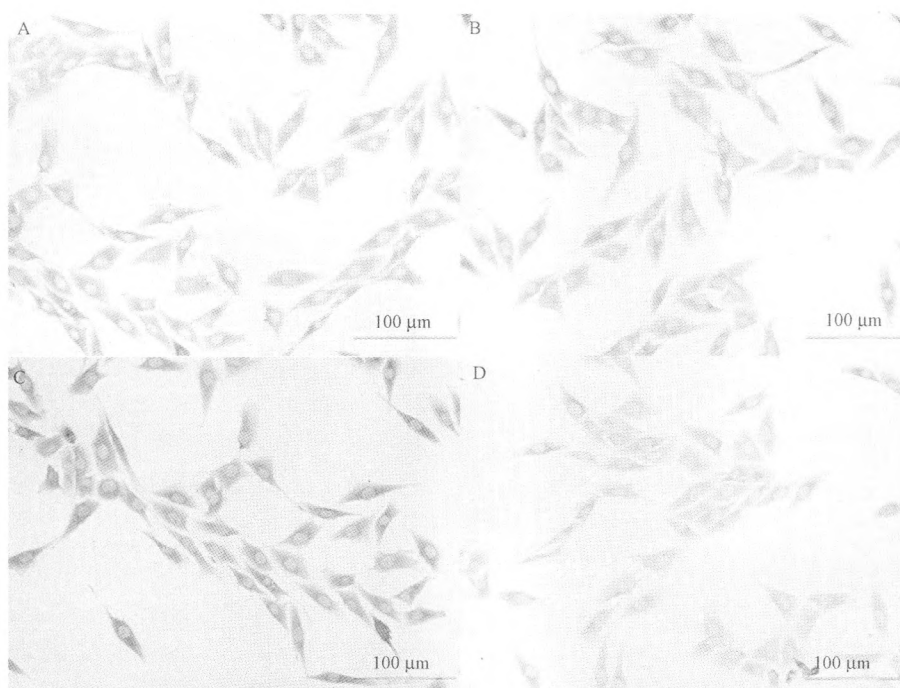


图 3 免疫细胞化学染色观察各组 OC 蛋白表达情况 (×200)

注:A:葛根素组;B:多孔钽组;C:葛根素多孔钽组;D:空白组

Fig. 3 The expression of OC protein of each group observed by immunocytochemical staining (×200)

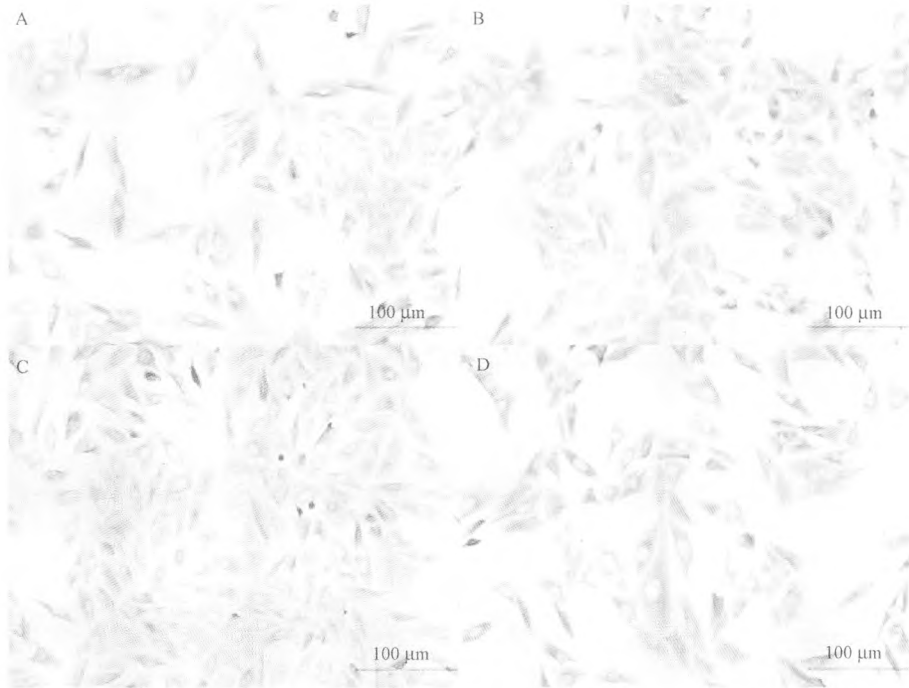


图 4 免疫细胞化学染色观察各组 OPN 蛋白表达情况 (×200)

注: A: 葛根素组; B: 多孔钽组; C: 葛根素多孔钽组; D: 空白组

Fig. 4 The expression of OPN protein of each group observed by immunocytochemical staining (×200)

3 讨论

钽素有“亲生物”金属之称,具有良好的生物相容性、较高的孔隙率和与人松质骨相近的弹性模量与强耐酸性等优势^[5,6]。许多学者将其称为骨小梁金属^[7]。多孔钽骨植入物现已广泛应用于关节置换、股骨头坏死、骨缺损等骨科领域。本研究采用的国产多孔钽支架材料呈三维连通多孔网状结构,扫描电镜观察多孔钽表面呈蜂窝状孔隙,内部包含大量微孔结构,直径约 400~600 μm,内部空隙相互连通。此材料是由重庆润泽医疗器械有限公司和国内多家高校科研机构共同研制的国产多孔钽。国产多孔钽材料表面粗糙,增加了成骨细胞与支架材料的接触面积,增加细胞对纤维素的捕获能力并且能够促进成骨细胞黏附与聚集,加快骨整合及整合强度,利于细胞黏附生长,可促进骨长入,加快骨形成^[8]。

葛根素一种异黄酮类化合物,具有减慢心率、扩张血管、降血压的作用,临床主要用于治疗高血压、心绞痛、脑供血不足和脑梗死^[9,10]。因其对骨质疏松有预防作用,近几年引起研究者的广泛关注。有研究通过体外培养人成骨细胞,发现葛根素能促进成骨细胞的增殖、分化,提高碱性磷酸酶活性,对碱性磷酸酶活性也有较好的刺激作用,这可能提示葛

根素具有提高成骨细胞骨形成的功能^[11]。因此,本研究进一步探索葛根素和国产多孔钽材料对成骨细胞影响的研究。扫描电镜观察表明葛根素对人成骨细胞在国产多孔钽支架上伸展性良好,可连接成片状,细胞基质分泌正常,细胞及细胞基质可覆盖多孔钽表面,具有良好的生物学相容性。CCK-8 法检测不同浓度葛根素和国产多孔钽支架对人成骨细胞增殖的影响。实验结果表明不同浓度的葛根素均促进成骨细胞的快速增殖,但以葛根素 1 μmol/L 组细胞增殖最快,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。国产多孔钽亦可促进成骨细胞的快速增殖,但葛根素多孔钽组相对其他各组成骨细胞的快速增殖更加显著 ($P < 0.05$),经多重比较分析,两者之间具有协同促进成骨细胞增殖的作用。本课题组前期研究也显示国产多孔钽具有良好的三维立体空间构型及良好的生物相容性,可促进成骨细胞粘附和生长^[12]。林凤飞等^[13]也研究发现多孔钽金属对成骨细胞生长无不良影响,且适应成骨细胞粘附、生长及分化,具有良好的生物相容性。臧洪敏等^[13]研究发现不同剂量的葛根素均可促进成骨细胞的增殖和分化及矿化的作用,以中高剂量作用最明显,与本研究结果相一致。

I 型胶原 (Type I collgaen, COL-I)、骨钙素

(osteocalcin, OC) 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是重要的成骨相关因子, 是成骨细胞分化的标志物。COL-I 由成骨细胞分泌的特异性胶原蛋白, 是主要的骨结构蛋白, 为钙盐沉积和细胞黏附提供支架, 可作为评价成骨细胞功能状态的指标; OC 是由成骨细胞特异性分泌的一种非胶原蛋白, 是成骨细胞向基质矿化的标志物, 可反映成骨细胞活性; OPN 也是成骨细胞的标志物之一, OPN 促进骨基质的吸收、矿化, 在参与骨形成与骨改建过程中发挥重要作用。

本研究采用 RT-PCR 法和免疫细胞化学染色法检测成骨细胞成骨相关因子 COL-I、OC、OPN mRNA 和蛋白的表达, 成骨细胞 COL-I、OC、OPN 蛋白均表达于胞浆, 阳性反应呈棕黄色颗粒。结果发现葛根素组和多孔钽组相较对照组均可促进成骨细胞 COL-I、OC mRNA 和蛋白的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 葛根素组和多孔钽组之间 COL-I、OC mRNA 和蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$), 葛根素多孔钽组细胞 COL-I、OC mRNA 和蛋白的表达均显著高于其它各组 ($P < 0.05$), 各组成骨细胞 OPN mRNA 和蛋白的表达无明显差异 ($P > 0.05$)。经析因方差分析得出, 葛根素和多孔钽支架两者具有协同促进成骨细胞 COL-I、OC 表达的作用, 对 OPN 的表达无显著影响。本课题组前期研究利用免疫细胞化学和 Western blot 法检测国产多孔钽复合 MG-63 细胞培养 Col-I、OC 和 OPN 蛋白表达, 结果提示多孔钽复合培养组出现 Col-I、OC 表达的增强, OPN 的表达无明显差异。国产多孔钽材料可能通过影响 Col-I、OC 的表达, 有利于 MG-63 细胞的黏附、生长, 具备良好的生物相容性^[15,16]。耿丽鑫等^[12]采用 RT-PCR 检测结果显示国产多孔钽促进成骨细胞成骨基因 OPN、OC 及 FN mRNA 的表达升高。袁斯远等^[17]等研究发现葛根素和雌二醇可增加 BSP、OC mRNA 的表达。葛根素和雌二醇能够减少 OPN mRNA 的表达, 表明葛根素能够通过影响成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 表达, 促进成骨细胞的分化。赵艳威等^[18]研究发现葛根素在 0.01 - 1 $\mu\text{mol/L}$ 剂量内, 以剂量依赖性方式显著提高 ALP 活性和 COL-I 的分泌促进人成骨细胞分化成熟,

综上所述, 本研究初步探索葛根素和国产多孔钽对人成骨细胞成骨相关因子 COL-I、OC、OPN 表达和细胞增殖的影响, 为葛根素和国产多孔钽支架材料治疗骨缺损、骨折愈合提供了科学的理论依据, 并且扩展了葛根素的药用价值和临床试用范围, 在固有临床治疗骨质疏松的基础上, 扩展了新的思路

与方法。并且提高了我国中药材葛根的使用范围, 推动了其药用价值和经济价值。同时在研究的过程中, 也是对中药材分子生物学实验的一种积极尝试和探索。也是对中西医结合治疗骨修复的一次积极的探索和尝试。葛根素可作为骨移植支架材料修复骨缺损的辅助药物, 并具有促成骨的作用, 为进一步临床应用提供理论和实践依据。

【参 考 文 献】

- [1] 姚丹, 丁选胜. 葛根素药理作用机制探讨及临床应用. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(4): 468-474.
Yao Dan, Ding Xuansheng. Discussions in pharmacological action and the development in clinical application of puerarin. Chin J Clin Pharmacol Ther. 2008, 13(4): 468-474. (in Chinese)
- [2] Sun J S, Li Y Y, Liu M H, et al. Effects of coumestrol on neonatal and adult mice osteoblasts activities. J Biomed Mater Res A, 2007, 81(1): 214-223.
- [3] 王海珍, 贡云飞, 苗志勃, 葛根素对大鼠成骨细胞增殖影响的体外实验研究. 中医药导报, 2013, 19(3): 77-79.
Wang Haizhen, Yun Yunfei, Miao Zhibo, et al. Effect of Puerarin on Proliferation of Rat Osteoblast in Vitro. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy. 2013, 19(3): 77-79. (in Chinese)
- [4] Jonitz A, Lochner K, Lindner T, et al. Oxygen consumption, acidification and migration capacity of human primary osteoblasts within a three-dimensional tantalum scaffold. Mater Sci Mater Med, 2011, 22(19): 2089-2095.
- [5] Bermudez M D, Carrion F J, Martinez N G, et al. Erosion-corrosion of stainless steels, titanium, tantalum and zirconium. Wear, 2005, 258(14): 693-700.
- [6] Tang Z, Xie Y, Yang F, et al. Porous Tantalum coatings prepared by vacuum plasma spraying enhance BMSCs osteogenic differentiation and bone regeneration in vitro and in vivo. PLoS One, 2013, 8(6): e66263.
- [7] Findlay D M, Welldon K, Atkins G J. The proliferation and phenotypic expression of human osteoblasts on tantalum metal. Biomaterials, 2004, 25(12): 2215-2227.
- [8] Xia L, Li Y, Zhou Z, et al. Icariin delivery porous PHBV scaffolds for promoting osteoblast expansion in vitro. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(6): 3545-3552.
- [9] 王维维. 葛根素对大鼠缺血性脑损伤的保护作用. 江苏大学学报: 医学版, 2013, 23(5): 373-376.
Wang Weiwei. Puerarin protection against cerebral ischemia via inhibiting nNOS in rats. Journal of Jiang su University (Medicine Edition). 2013, 23(5): 373-376. (in Chinese)
- [10] 张环宇, 李大伟, 史彩虹. 葛根素的临床应用研究进展. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 75-78.
Zhang Huanyu, Li Dawei, Shi Caihong. Advances in studies on clinical practice of puerarin. Drugs & Clinic. 2012, 27(1): 75-78. (in Chinese)

- [11] Addison WN, Azari F, Sorensen ES, et al. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem.* 2007; 282 (21): 15872-15883.
- [12] 耿丽鑫,甘洪全,王茜,等. 国产多孔钽对成骨细胞生物相容性及其相关成骨基因表达的影响. 第三军医大学学报, 2014, 36(11):1163-1167.
Geng Lixing, Gan Hongquan, Wang Qian, et al. Effect of domestic porous tantalum on biocompatibility and osteogenic gene expression. *Journal of Third Military Medical University.* 2014, 36(11):1163-1167. (in Chinese)
- [13] 林凤飞,郑明,刘柏玲,等. 多孔钽金属与成骨细胞生物相容性的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(12):1119-1123.
Lin Fengfei, Zheng Ming, Liu Boling, et al. In vitro biocompatibility study of the osteoblast response to porous tantalum. *Orthopedic Journal of China.* 2014, 22(12):1119-1123. (in Chinese)
- [14] 臧洪敏,陈君长,刘亦恒,等. 葛根素对成骨细胞生物学作用的实验研究. 中国中药杂志, 2005, 30(24):1947-1949.
Zang Hongmin, Chen Junchang, Liu Yiheng, et al. Experimental study of the effects of puerarin on biological characters of osteoblasts in vitro. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(24):1947-1949. (in Chinese)
- [15] 王茜,张辉,耿丽鑫,等. MG63 细胞与国产多孔钽材料共培养后成骨相关因子的表达研究. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(11):1393-1398.
Wang Qian, Zhang Hui, Geng Lixin, et al. Expressions of osteogenesis related factors in MG63 cells co-cultured with domestic porous tantalum. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery.* 2014, 28 (11): 1393-1398. (in Chinese)
- [16] 王茜,张辉,耿丽鑫,等. 国产多孔粗复合 MG63 细胞培养 COL-I、OC 和 OPN 蛋白表达及意义. 中国矫形外科, 2015, 23(5):441-449.
Wang Qian, Zhang Hui, Geng Lixin, et al. Expression of type I collagen, osteocalcin, and osteopontin in MG63 osteoblasts cultured with domestic porous Tantalum. *Orthopedic Journal of China.* 2015, 23(5):441-449. (in Chinese)
- [17] 袁斯远,孔蓓蓓,盛彤,等. 葛根素干预小鼠成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 的表达. 中国组织工程研究, 2014, 18(42):6732-6736.
Yuan Siyuan, Kong Beibei, Sheng Tong, et al. Puerarin effects on the mRNA expression of osteoblast differentiation-related Proteins. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research.* 2014, 18(42):6732-6736. (in Chinese)
- [18] 赵艳威,李宗旻,宋光明,等. 葛根素促进人成骨样 MG-63 细胞分化的分子机制研究. 中草药, 2014, 45(4):536-540.
Zhao Yanwei, Li Zongmin, Song Guangming, et al. Molecular mechanism for promotion of puerarin on differentiation in human osteoblast-like MG-63 cells. *Chinese Traditional and Herbal Drugs.* 2014, 45(4):536-540. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-08-28;修回日期:2016-10-12)

(上接第 215 页)

- [5] Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2015, 6(3):456-80.
- [6] 段志胜 陈春燕. 肠促胰素与糖尿病性骨质疏松症的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2015, (2):228-230, 248.
DUAN zhisheng, CHEN chunyan. Study of the effect of different gender and age on bone metalolic indexes, serum osteoprotegerin, and bone mineral density in primary osteoporosis (in chinese) 2015, (2):228-230, 248.
- [7] Marette A. Pathogenic role of inflammatory cytokines in obesity: from insulin resistance to diabetes mellitus. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*, 2004;9:141-50.
- [8] Okazaki R. Links between osteoporosis and atherosclerosis; beyond insulin resistance. *Clin Calcium.* 2008, 18(5):638-43.
- [9] Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008, 14(3-4):222-31.
- [10] Gillespie MT. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9: 103.
- [11] Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*, 1998, 128: 127-137.
- [12] Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev*, 2005, 208: 154-168.
- [13] Pradhan AD, Cook NR, Buring JE, et al. C-reactive protein is independently associated with fasting insulin in nondiabetic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(4): 650-655.
- [14] Eleftheriadis T, Kartsios C, Antoniadi G, et al. The impact of chronic inflammation on bone turnover in hemodialysis patients. *Renal Failure*, 2008, 30(4): 431-437.
- [15] Ding C, Parameswaran V, Udayan R, et al. Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: A longitudinal study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, 93(5): 1952-1958.

(收稿日期: 2016-08-30;修回日期:2016-10-20)